

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-139457

(P2000-139457A)

(43) 公開日 平成12年5月23日 (2000.5.23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 9/12		C 1 2 N 9/12	4 B 0 2 4
1/21		1/21	4 B 0 5 0
15/09	Z N A	15/00	Z N A A 4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 9/12			
C 1 2 R 1:92)			

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-319241

(22) 出願日 平成10年11月10日 (1998.11.10)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 荒川 琢

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 西矢 芳昭

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 川上 文清

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型逆転写酵素

(57) 【要約】

【課題】従来よりもより高い温度域において反応できる、完全長のcDNAが取得するのに十分な伸長性の高い逆転写酵素を提供する。

【解決手段】野生型に比して、特に42～60℃の範囲で伸長性を向上せしめたモロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) に由来する変異型逆転写酵素。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 野生型に比して伸長性が向上したことを特徴とする変異型逆転写酵素。

【請求項2】 伸長性が42～60℃の範囲で向上した請求項1記載の変異型逆転写酵素。

【請求項3】 RNaseH活性を実質的に有していない請求項1または2に記載の変異型逆転写酵素。

【請求項4】 Tyr Met Asp Asp で表されるアミノ酸配列を含む請求項1～3のいずれかに記載の変異型逆転写酵素。

【請求項5】 モロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) に由来する請求項1～4のいずれかに記載の変異型逆転写酵素。

【請求項6】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなる請求項5記載の変異型逆転写酵素。

【請求項7】 配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有することを特徴とするDNAフラグメント。

【請求項8】 配列番号2に記載されるヌクレオチド配列を含む請求項7記載のDNAフラグメント。

【請求項9】 請求項7または8に記載のDNAフラグメントをベクターに挿入したことを特徴とするDNA組換えベクター。

【請求項10】 請求項9記載のDNA組換えベクターを用いて形質転換されたことを特徴とする組換え宿主細胞。

【請求項11】 宿主細胞がエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) である請求項10記載の組換え宿主細胞。

【請求項12】 請求項10または11に記載の組換え宿主を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする変異型逆転写酵素の製造方法。

【請求項13】 請求項1～6のいずれかに記載の変異型逆転写酵素を用い、かつRNAを鋳型とすることを特徴とするcDNAの合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は伸長性に高温域での伸長性に優れた逆転写酵素、該逆転写酵素をコードする遺伝子および該遺伝子を使用する該逆転写酵素の製造方法ならびに該逆転写酵素を利用したcDNAの合成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来からレトロウイルス、特にモロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) やヒト後天性免疫不全ウイルス (HIV)、トリ骨髄芽症ウイルス (AMV) 由来の逆転写酵素については多くの研究がなされ、様々な機能、性質が知られてきている。加えて、RNAを鋳型としてこれに相補的なDNA (cDNA) を合成することができるという特徴的な性質により、多くの分

子生物学的手法、例えばcDNAライブラリーの構築、RT-PCRなどに用いられている。mRNAの塩基配列は、発現されている蛋白質のアミノ酸配列を反映していることから、その解析の意義は遺伝子産物の機能を知る上で非常に大きい。

【0003】 一方、これまでに報告されているレトロウイルス由来の逆転写酵素の多くが、DNA-RNAハイブリッド2本鎖のRNAを分解する活性、すなわちRNaseH活性を有することが知られている。この活性の存在は、cDNAを合成する際に鋳型-プライマー複合体の鋳型を分解し、その分解位置がプライマーの3'端に近い場合は、鋳型-プライマー複合体が解離されるため伸長性が低下するという結果を招く。このような問題を排除するため、実質的にRNaseH活性を有していない逆転写酵素が開発されてきた。

【0004】 モロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) 由来の逆転写酵素は、そのアミノ酸配列の相同性および様々な機能解析から、その蛋白質のC末端側約200残基がRNaseH活性を担うドメインであることが知られている (Reverse transcriptase, Cold Spring Harbor Monograph 第135～162頁、1993年)。現在、RNaseH活性を欠失したMMLV由来の逆転写酵素としては、RNaseHドメインのアミノ酸を削除したデリーション型が東洋紡績から、アミノ酸の置換により機能を欠失した点変異型がスーパースクリプトIIという商品名でライフテクノロジー社から入手することが可能である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、これらの逆転写酵素をもってしても完全長のcDNAが取得できない場合がある。その理由としては、鋳型RNAの配列に起因する高次構造のため逆転写酵素の結合が阻害される、あるいは合成途上のDNA鎖の3'末端に鋳型RNAと相補的でないヌクレオチドが取り込まれ伸長反応が阻害されるといったことが考えられている。そのため、従来のものよりも、より高い温度域において反応できる伸長性の高い逆転写酵素の開発が待ち望まれている。

【0006】

【課題を解決するための手段】 これまで報告されている逆転写酵素のアミノ酸配列はいくつかの共通の保存領域を有するが、その中でもTyr (タイロシン) -X-Asp (アスパラギン酸) -Asp (アスパラギン酸) で表される配列はほとんどの逆転写酵素に存在する。Xについては様々なバリエーションがあり、モロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) カリフラワーモザイクウイルス (CAMV) ではバリン、ヒト後天性免疫不全ウイルス (HIV)、ラウスサルコーマウイルス (RSV) ではメチオニンなどである。この領域は結晶構造解析などから2価金属イオンの結合部位として機能することが

知られており、酵素活性の発現に重要な役割を果たしている (Structure 第15巻、第879～892頁、1995年)。

【0007】さらに最近になって、Xのアミノ酸の種類がHIV由来の逆転写酵素の伸長性に大きく関与しているという報告がなされた。すなわち、HIV由来の逆転写酵素の野生型はXの位置にメチオニンをもつが、これをバリンあるいはスレオニンに変換すると、鋳型に対して誤ったヌクレオチドが取り込まれた (ミスインコーポレーションされた) 伸長鎖の3' 端を伸長する能力が低下するという現象が報告されている (Nucleic Acids Research 第25巻、第3212～3217頁、1997年)。

【0008】本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意検討の結果、MMLV由来の逆転写酵素にポイントミューテーションによる改良を加えることにより、野生型の該逆転写酵素に比して伸長性、耐熱性を向上することができることを見出し、本発明に到達した。その具体的な例としては、MMLV由来の逆転写酵素の584番目のアスパラギン酸をアスバラギンに置換するアミノ酸変異を加え、RNase H活性を欠失したものに、さらに上述の保存領域のXに相当する224番目のバリンをメチオニンに置換するアミノ酸変異を加えることにより、cDNA合成の伸長性が、従来の反応温度領域である42℃から従来は反応性に乏しかった60℃の間で向上せしめるものである。

【0009】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 野生型に比して伸長性が向上したことを特徴とする変異型逆転写酵素。

(2) 伸長性が42～60℃の範囲で向上した(1)の変異型逆転写酵素。

(3) RNase H活性を実質的に有していない(1)または(2)の変異型逆転写酵素。

(4) Tyr Met Asp Asp で表されるアミノ酸配列を含む(1)～(3)のいずれかの変異型逆転写酵素。

(5) モロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) に由来する(1)～(4)のいずれかの変異型逆転写酵素。

(6) 配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなる(5)の変異型逆転写酵素。

(7) 配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有することを特徴とするDNAフラグメント。

(8) 配列番号2に記載されるヌクレオチド配列を含む(7)のDNAフラグメント。

(9) (7)または(8)のDNAフラグメントをベクターに挿入したことを特徴とするDNA組換えベクター。

(10) (9)のDNA組換えベクターを用いて形質転換されたことを特徴とする組換え宿主細胞。

(11) 宿主細胞がエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) である(10)の組換え宿主細胞。

(12) (10)または(11)の組換え宿主を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする変異型逆転写酵素の製造方法。

(13) (1)～(6)いずれかの変異型逆転写酵素を用い、かつRNAを鋳型とすることを特徴とするcDNAの合成方法。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明における変異型逆転写酵素は、野生型に比してcDNA合成の伸長性が向上したことを特徴とするものである。特に42～60℃の範囲において、すなわち、従来の反応温度領域である42℃から、従来は反応性に乏しかった60℃までの間で向上したものである。ここで、逆転写酵素の伸長性とは、より長いcDNAを合成する能力のことをいう。また、変異型逆転写酵素とは、野生型逆転写酵素に対しアミノ酸の置換、欠失、挿入等の変異操作を行うことにより得られるものをいう。

【0011】本発明における変異型逆転写酵素は、好適にはRNase H活性を実質的に有していない。ここで、RNase H活性を実質的に有していないとは、逆転写活性1ユニットにつきRNase H活性10⁻⁴ユニット以下のものをいう。

【0012】本発明における逆転写酵素の好適な例としては、Tyr Met Asp Asp で表されるアミノ酸配列を含んでいる。該アミノ酸配列を有する逆転写酵素は、例えば、MMLV由来の逆転写酵素にアミノ酸変異を導入することにより得ることができる。本発明においてアミノ酸変異の導入は、当業者がなし得る方法であればいかなる方法でもよい。例えば、サイトディレクテッドミュータジェネシス法が挙げられる (Methods Enzymol. 第154巻、第382頁、1987年)。

【0013】本発明のDNAフラグメントは、伸長性の向上した変異型逆転写酵素をコードするDNAであり、該DNAフラグメントの一例は配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する。また、このようなDNAは配列番号2に記載される塩基配列またはその一部分を含有する。

【0014】さらに本発明のDNA組換えベクターは、上記DNAフラグメントをベクターに挿入することにより得られるものである。該ベクターは、変異型逆転写酵素のクローニング及び発現を可能とするものであればいかなるものでもよく、例えばファージ及びプラスミドが挙げられる。プラスミドとしてはpUC118、pUC18、pBR322、pBluescript、pLED-M1、p73、pGW7、pET3a、pET8cなどが挙げられる。一方、ファージとしては例えばλgt11、λZAPIIなどが挙げられる。

【0015】また本発明の組換え宿主細胞は、上記DN

A組換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換することにより得られるものである。該宿主細胞としては、大腸菌、酵母などが挙げられ、特に大腸菌が好ましい。大腸菌としては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) DH5 α 、JM109、HB101、XL1Blue、PR1、HS641 (DE3)、BL21 (DE3) などが挙げられる。すなわち、本発明においては、上記の伸長性の向上した変異型逆転写酵素をコードする遺伝子を上記ベクターに挿入してDNA組換えベクターとし、さらに該組換え発現ベクターにて宿主細胞を形質転換する。

【0016】また、本発明における変異型逆転写酵素の製造方法は、上記組換え宿主細胞を培養し、培養液から逆転写酵素を採取することを特徴とする。該組換え宿主細胞の培養に使用する培地ならびに条件は常法に従う。具体例としては、伸長性の向上した変異型逆転写酵素遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された大腸菌を、例えばTB培地にて培養することにより、該変異型逆転写酵素を得ることができる。

【0017】上記変異型逆転写酵素の精製方法としては、例えば、(a) 組換え宿主を集めた後、破碎して、細胞抽出物を調製し、(b) 宿主細胞由来の不純蛋白質を除去する工程を含む。組換え宿主細胞より産出された伸長性の向上した変異型逆転写酵素は、宿主菌体を培地で培養後、培養液から遠心分離等にて分離・回収する。該菌体を緩衝液に再懸濁した後、超音波処理、ダイノミル・フレンチプレス等により菌体を破碎する。

【0018】次いで、カラムクロマトグラフィーを実施し、伸長性の向上した変異型逆転写酵素を回収する。カラムクロマトグラフィーは、陽イオン交換体、例えばフォスホセルロース、あるいは疎水性吸着体、例えばブチルセファロース、あるいはアフィニティー吸着体へパリンセファロースなどが好ましい。

【0019】上記のようにして取得した伸長性の向上した変異型逆転写酵素の分子量は、好ましくは約74kDaである。

【0020】本発明における変異型逆転写酵素を用いることにより、RNAを鋳型とし、より長いcDNAを合成することを可能とする。本発明における変異型逆転写酵素を用いて合成可能なcDNAの長さは、その反応条件等によっても異なるが、少なくとも9.4kb以上の伸長が可能であり、条件次第では従来の逆転写酵素を用いては実現出来なかった14kb以上の伸長も可能とする。本発明の変異型逆転写酵素を用いた場合、同一の条件で従来の野生型の逆転写酵素を用いた場合とその伸長性を対比した場合、2倍以上の伸長性を増大することができる。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0022】実施例1 MMLV逆転写酵素への点突然変異の導入

野生型MMLV逆転写酵素発現プラスミドpRT30-2はコロンビア大学・ゴッフ教授より分譲入手した。

【0023】点突然変異の導入はトランスフォーマーキット (クロンテック製) を用い、説明書の指示に従って行った。2種の制限酵素選択プライマーおよび2種の変異導入プライマー (配列番号3、4、5、6) を合成した。配列番号3はベータラクタマーゼ遺伝子中のScaI部位をMluIに変換するプライマーである。配列番号4は上記で変換されたベータラクタマーゼ遺伝子中のMluI部位をScaIに変換するプライマーである。配列番号5はMMLV逆転写酵素遺伝子中の670番目のグアニンをアデニンに変換する (すなわち、アミノ酸配列の224番目のバリンをメチオニンに変換する) プライマーである。配列番号6はMMLV逆転写酵素遺伝子中の1750番目のグアニンをアデニンに変換する (すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸をアスパラギンに変換する) プライマーである。

【0024】それぞれのプライマー200pmolを1mM ATP、5ユニット ポリヌクレオチドキナーゼ (東洋紡績製) を含むキナーゼバッファー中、37℃で30分間インキュベートし、5'末端をリン酸化した。その後、75℃で15分間インキュベートしてポリヌクレオチドキナーゼを失活させた。

【0025】pRT30-2 0.1 μ g、5'末端をリン酸化した配列番号3および6のプライマーをそれぞれ10pmol、上記キット添付のアニーリングバッファー2 μ lを含む20 μ lの溶液を、100℃で3分間インキュベートした後、直ちに5分間氷冷した。

【0026】これに蒸留水5 μ l、キット添付のシンセシスバッファー3 μ l、T4リガーゼ1 μ l、T4DNAポリメラーゼ1 μ lを加え、37℃で1時間インキュベートした後、75℃で15分間インキュベートし酵素を失活させた。これにHバッファー3 μ l、ScaI 20ユニットを加え37℃で2時間インキュベートした。

【0027】このうち1 μ lをエシェリヒア・コリBMH71-18株コンピテントセル100 μ lに加え、30分間氷冷した後、42℃で30秒間インキュベートし、900 μ lのSOC培地を加え37℃で1時間インキュベートした。これに50 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地5mlを加え、37℃で一晩インキュベートした。

【0028】上記のようにして得られた菌体から定法によりプラスミドを抽出し、そのうち50ngにScaI 10ユニット、Hバッファー2 μ lを加え全量を20 μ lとし、37℃で2時間インキュベートした。この反応液2 μ lをエシェリヒア・コリDH5 α コンピテントセルに加えて、定法に従い形質転換した。

【0029】上記のようにして得られたコロニーをLB

培地2. 5 mlに懸濁し、一晚培養した後、定法に従いプラスミドを抽出した。このプラスミドがMluIで切断されるものについて塩基配列をサンガー法で確認し、MMLV逆転写酵素遺伝子中の1747番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変換されている）プラスミドpD584Nを取得した。

【0030】上記と同様にして、配列番号5のプライマーを用い、MMLV逆転写酵素遺伝子中の670番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の223番目のバリンがメチオニンに変換されている）プラスミドpV224Mを取得した。

【0031】また、pD584Nをもとに配列番号4および5のプライマーを用い1750番目のグアニンがアデニンに変換され（すなわち、アミノ酸配列の584番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変換されている）、かつ670番目のグアニンがアデニンに変換されている（すなわち、アミノ酸配列の224番目のバリンがメチオニンに変換されている）プラスミドpDNVMを取得した。

【0032】実施例2 形質転換体の作製

実施例1で得られた各プラスミド1 ngをエシエリヒア・コリDH5α100 μlに加え、30分間氷冷した後、42℃で30秒間インキュベートし、900 μlのSOC培地を加え37℃で1時間インキュベートした。これを50 μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上にて37℃で一晚インキュベートし、形質転換体を得た。

【0033】実施例3 形質転換体の培養

実施例2で得られた各形質転換体を100 μg/mlのアンピシリンを含むTB培地100 mlに懸濁し、37℃で一晚インキュベートした。得られた菌体を12,000回転/分で5分間遠心分離することにより回収した。

【0034】実施例4 MMLV逆転写酵素の精製

実施例3で得られたそれぞれの菌体について以下の操作*

蒸留水	12 μl
5×1st strand synthesis buffer	2.0 μl (LifeTech製)
10 mM dNTP	2.0 μl
(α-32P) dTTP (370 kBq/μl)	1.0 μl
RNA Ladder	0.5 μl (LifeTech製)
100 pmol/μl (dT) 30	1.0 μl
RNAseインヒビター (20 units/μl)	0.5 μl
逆転写酵素 (10 units/μl)	1.0 μl

【0038】比較のため、逆転写酵素は野生型、RNAse H欠失型（東洋紡績製）、Superscript II (LifeTech製) および実施例4で得られたV223M+D583Nを用いた。これを42℃、50℃、55℃、60℃で1時間インキュベートした。停止液 (20 mM Tris-HCl (pH8.0)、10

10 *を行った。菌体10 gをバッファー1 (20 mMトリス-塩酸 (pH7.5)、5 mM EDTA、5 mMメルカプトエタノール、100 mM塩化ナトリウム) 20 mlに懸濁した。これを超音波破砕機で破砕し、12000回転/分で10分間遠心分離することにより沈殿を分離した。得られた上清に0.6%ポリエチレンジオキサン溶液を0.4 ml添加し、30分間攪拌した。これを12000回転/分で10分間遠心分離することにより沈殿を分離し、上清を回収した。この液に硫酸アンモニウムを4.56 g加え、30分間攪拌した。これを12000回転/分で10分間遠心分離することにより沈殿を分離し回収した。

20 【0035】得られた沈殿をバッファー2 (20 mMトリス-塩酸 (pH7.5)、0.1 mM EDTA、5 mMメルカプトエタノール、50 mM塩化ナトリウム、10%グリセロール) 5 mlに溶解し、100 mlのバッファー2に対して透析した。これをDEAEセファロースカラム (5 ml) にチャージし、非吸着画分を回収した。これをフォスフォセルロースカラム (5 ml) にチャージし、10 mlのバッファー2で洗浄後、0~500 mM NaClのグラジェントバッファー2 40 mlで溶出した。

【0036】得られたフラクションのうち、逆転写酵素活性を含みRNAse H活性を有していない画分をプールした。次いで、これをヘパリンセファロースカラム (3 ml) に供し、0~1 M NaClのグラジェントバッファー2により溶出し、逆転写酵素活性を含む画分を回収した。以上の操作により、SDS-PAGEにおいては単一のバンドを示す10 mgの蛋白質を得た。pD584Nを有する菌体から得られた蛋白質をD584N、pV224Mを有する菌体から得られた蛋白質をV224M、pDNVMを有する菌体から得られた蛋白質をV224M+D584Nとした。

【0037】実施例5 cDNA合成伸長能力の比較
下記の組成物を調製した。

mM EDTA、0.05%BPB、20%グリセロール) を4 μl加えて反応終了後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。ゲルドライヤーにてゲルを乾燥した後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、V224M+D584Nで合成を行ったものは42℃から60℃の間で他の酵素に比べ、より長いcDNAの伸長

が観察された。

【0039】実施例6 RT-PCRによるcDNA合成伸長能力の比較

ヒトジストロフィンのmRNAは約1.4 kbの長さを持つことが知られている。配列番号7に示されるオリゴヌクレオチドはこのmRNAの3' 端に相補的に結合するように設計されている。このプライマーを用いてcDNA合成反応を行った後、配列番号8および9に示される*

*プライマーセットを用いPCRを行った。このプライマーセットはmRNAの5' 端約400 bpを増幅するように設計されており、cDNA合成が5' 端まで到達していれば増幅が確認できる。

【0040】cDNA合成反応は以下の反応液を調製し、42℃で30分インキュベートすることにより行った。

【0041】

蒸留水	11 μ l
5×1st strand synthesis buffer	4.0 μ l (東洋紡績製)
10 mM dNTP	2.0 μ l
ヒト骨格筋polyA+RNA (0.1 μ g/ μ l)	1.0 μ l (CloneTech 製)
プライマー配列番号7 (10 pmol/ μ l)	1.0 μ l
逆転写酵素 (100 units/ μ l)	1.0 μ l

【0042】PCRは以下の反応液を調製し、98℃で30秒、68℃で30秒の熱サイクルを30回繰り返す※

【0043】

蒸留水	7.0 μ l
10×KOD dash buffer	2.0 μ l (東洋紡績製)
cDNA合成反応液	8.0 μ l
プライマー配列番号8 (10 pmol/ μ l)	1.0 μ l
プライマー配列番号9 (10 pmol/ μ l)	1.0 μ l
KOD dash (2.5 units/ μ l)	1.0 μ l (東洋紡績製)

【0044】熱サイクル終了後、反応液5 μ lをアガロースゲル電気泳動に供し、増幅産物を検出した。その結果、図2に示されるようにV224M+D584NでcDNA合成を行ったものは増幅産物が確認され、約1.4 kbのcDNAが合成されていることが示唆されたが、野生型およびスーパースクリプトIIにおいては増幅産物が観察されなかった。これよりV224M+D584Nはこれらの酵素に比べて、より長いcDNAの伸長が可能であることが示唆された。

★【0045】

【発明の効果】上述したように、本発明における伸長性の向上した変異型逆転写酵素は、42～60℃の間で野生型および従来のRNase H欠失型の逆転写酵素に比べて、伸長性が向上しており、完全長cDNAを合成するのに適した酵素である(図1参照)。

【0046】

【配列表】

配列番号1

配列の長さ: 672 (アミノ酸)

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

```

MET Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr Ser Lys
1           5           10          15
Glu Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln
20          25          30
Ala Trp Ala Glu Thr Gly Gly MET Gly Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro
35          40          45
Leu Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln
50          55          60
Tyr Pro MET Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His Ile Gln
65          70          75          80
Arg Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn
85          90          95
Thr Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro

```

(7)

特開2000-139457

11			12
	100	105	110
Val Gln Asp Leu Arg Glu Val	Asn Lys Arg Val	Glu Asp Ile His Pro	
	115	120	125
Thr Val Pro Asn Pro Tyr Asn	Leu Ser Gly Leu	Pro Pro Ser His	
	130	135	140
Gln Trp Tyr Thr Val Leu	Asp Leu Lys Asp Ala Phe	Phe Cys Leu Arg	
145	150	155	160
Leu His Pro Thr Ser Gln	Pro Leu Phe Ala Phe	Glu Trp Arg Asp Pro	
	165	170	175
Glu MET Gly Ile Ser Gly	Gln Leu Thr Trp Thr	Arg Leu Pro Gln Gly	
	180	185	190
Phe Lys Asn Ser Pro Thr	Leu Phe Asp Glu Ala	Leu His Arg Asp Leu	
	195	200	205
Ala Asp Phe Arg Ile Gln	His Pro Asp Leu Ile	Leu Leu Gln Tyr MET	
	210	215	220
Asp Asp Leu Leu Leu Ala	Ala Thr Ser Glu Leu	Asp Cys Gln Gln Gly	
225	230	235	240
Thr Arg Ala Leu Leu Gln	Thr Leu Gly Asn Leu	Gly Tyr Arg Ala Ser	
	245	250	255
Ala Lys Lys Ala Gln Ile	Cys Gln Lys Gln Val	Lys Tyr Leu Gly Tyr	
	260	265	270
Leu Leu Lys Glu Gly Gln	Arg Trp Leu Thr Glu	Ala Arg Lys Glu Thr	
	275	280	285
Val MET Gly Gln Pro Thr	Pro Lys Thr Pro Arg	Gln Leu Arg Glu Phe	
	290	295	300
Leu Gly Thr Ala Gly Phe	Cys Arg Leu Trp Ile	Pro Gly Phe Ala Glu	
305	310	315	320
MET Ala Ala Pro Leu Tyr	Pro Leu Thr Lys Thr	Gly Thr Leu Phe Asn	
	325	330	335
Trp Gly Pro Asp Gln Gln	Lys Ala Tyr Gln Glu	Ile Lys Gln Ala Leu	
	340	345	350
Leu Thr Ala Pro Ala Leu	Gly Leu Pro Asp Leu	Thr Lys Pro Phe Glu	
	355	360	365
Leu Phe Val Asp Glu Lys	Gln Gly Tyr Ala Lys	Gly Val Leu Thr Gln	
	370	375	380
Lys Leu Gly Pro Trp Arg	Arg Pro Val Ala Tyr	Leu Ser Lys Lys Leu	
385	390	395	400
Asp Pro Val Ala Ala Gly	Trp Pro Pro Cys Leu	Arg MET Val Ala Ala	
	405	410	415
Ile Ala Val Leu Thr Lys	Asp Ala Gly Lys Leu	Thr MET Gly Gln Pro	
	420	425	430
Leu Val Ile Leu Ala Pro	His Ala Val Glu Ala	Leu Val Lys Gln Pro	
	435	440	445
Pro Asp Arg Trp Leu Ser	Asn Ala Arg MET Thr	His Tyr Gln Ala Leu	
	450	455	460
Leu Leu Asp Thr Asp Arg	Val Gln Phe Gly Pro	Val Val Ala Leu Asn	
465	470	475	480
Pro Ala Thr Leu Leu Pro	Leu Pro Glu Glu Gly	Leu Gln His Asn Cys	
	485	490	495
Leu Asp Ile Leu Ala Glu	Ala His Gly Thr Arg	Pro Asp Leu Thr Asp	

(8)

特開2000-139457

13 500 505 510 14

Gln Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp Gly Ser Ser

515 520 525

Leu Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala Val Thr Thr Glu

530 535 540

Thr Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Ser Ala Gln

545 550 555 560

Arg Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala Leu Lys MET Ala Glu Gly

565 570 575

Lys Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asn Ser Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala

580 585 590

His Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu

595 600 605

Gly Lys Glu Ile Lys Asn Lys Asp Glu Ile Leu Ala Leu Lys Ala

610 615 620

Leu Phe Leu Pro Lys Arg Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln

625 630 635 640

Lys Gly His Ser Ala Glu Ala Arg Gly Asn Arg MET Ala Asp Gln Ala

645 650 655

Ala Arg Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu

660 665 670

【0047】

配列番号2

配列の長さ: 2019

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

起源: Molony Murine Leukemia Virus

配列

ATG ACC CTA AAT ATA GAA GAT GAG CAT CCG CTA CAT GAG ACC TCA AAA 48

GAG CCA GAT GTT TCT CTA GCG TCC ACA TGG CTG TCT GAT TTT CCT CAG 96

GCC TGG CCG GAA ACC GGG GGC ATG GGA CTG GCA GTT GGC CAA GCT CCT 144

CTG ATC ATA CCT CTG AAA GCA ACC TCT ACC CCC GTG TCC ATA AAA CAA 192

TAC CCC ATG TCA CAA GAA GCC AGA CTG GGG ATC AAG CCC CAC ATA CAG 240

AGA CTG TTG GAC CAG GGA ATA CTG GTA CCC TGC CAG TCC CCC TGG AAC 288

ACG CCC CTG CTA CCC GTT AAG AAA CCA GCG ACT AAT GAT TAT AGG CCT 336

GTC CAG GAT CTG AGA GAA GTC AAC AAG CCG GTG GAA GAC ATC CAC CCC 384

ACC GTG CCC AAC CCT TAC AAC CTC TTG ACC GGG CTC CCA CCG TCC CAC 432

CAG TGG TAC ACT GTG CTT GAT TTA AAG GAT GCC TTT TTC TGC CTG AGA 480

CTC CAC CCC ACC AGT CAG CCT CTC TTC GCC TTT GAG TGG AGA GAT CCA 528

GAG ATG GCA ATC TCA GGA CAA TTG ACC TGG ACC AGA CTC CCA CAG GGT 576

TTC AAA AAC AGT CCC ACC CTG TTT GAT GAG GCA CTG CAC AGA GAC CTA 624

GCA GAC TTC CCG ATC CAG CAC CCA GAC TTG ATC CTG CTA CAG TAC ATG 672

GAT GAC TTA CTG CTG GCC GCC ACT TCT GAG CTA GAC TGC CAA CAA GGT 720

ACT CCG GCC CTG TTA CAA ACC CTA GGG AAC CTC GGG TAT CCG GCC TCG 768

GCC AAG AAA GCC CAA ATT TGC CAG AAA CAG GTC AAG TAT CTG GGG TAT 816

CTT CTA AAA GAG GGT CAG AGA TGG CTG ACT GAG GCC AGA AAA GAG ACT 864

GTG ATG CCG CAG CCT ACT CCG AAG ACC CCT CGA CAA CTA AGG GAG TTC 912

CTA GGG ACG GCA GGC TTC TGT CCG CTC TGG ATC CCT GGG TTT GCA GAA 960

15

ATG GCA CCC CCC TTG TAC CCT CTC ACC AAA ACG GGG ACT CTG TTT AAT 1008
 TGG GGC CCA GAC CAA CAA AAG GCC TAT CAA GAA ATC AAG CAA GCT CTT 1056
 CTA ACT GCC CCA GCC CTG GGG TTG CCA GAT TTG ACT AAG CCC TTT GAA 1104
 CTC TTT GTC GAC GAG AAG CAG GGC TAC GCC AAA GGT GTC CTA ACG CAA 1152
 AAA CTG GGA CCT TGG CGT CGG CCG GTG GCC TAC CTG TCC AAA AAG CTA 1200
 GAC CCA GTA GCA GCT GGG TGG CCC CCT TGC CTA CGG ATG GTA GCA GCC 1248
 ATT GCC GTA CTG ACA AAG GAT GCA GGC AAG CTA ACC ATG GGA CAG CCA 1296
 CTA GTC ATT CTG GCC CCC CAT GCA GTA GAG GCA CTA GTC AAA CAA CCC 1344
 CCC GAC CGC TGG CTT TCC AAC GCC CGG ATG ACT CAC TAT CAG GCC TTG 1392
 CTT TTG GAC ACG GAC CGG GTC CAG TTC GGA CCG GTG GTA GCC CTG AAC 1440
 CCG GCT ACG CTG CTC CCA CTG CCT GAG GAA GGG CTG CAA CAC AAC TGC 1488
 CTT GAT ATC CTG GCC GAA GCC CAC GGA ACC CGA CCC GAC CTA ACG GAC 1536
 CAG CCG CTC CCA GAC GCC GAC CAC ACC TGG TAC ACG GAT GGA AGC AGT 1584
 CTC TTA CAA GAG GGA CAG CGT AAG GCG GGA GCT GCG GTG ACC ACC GAG 1632
 ACC GAG GTA ATC TGG GCT AAA GCC CTG CCA GCC GGG ACA TCC GCT CAG 1680
 CGG GCT GAA CTG ATA GCA CTC ACC CAG GCC CTA AAG ATG GCA GAA GGT 1728
 AAG AAG CTA AAT GTT TAT ACT AAT AGC CGT TAT GCT TTT GCT ACT GCC 1776
 CAT ATC CAT GGA GAA ATA TAC AGA ACG CGT GGG TTG CTC ACA TCA GAA 1824
 GGC AAA GAG ATC AAA AAT AAA GAC GAG ATC TTG GCC CTA CTA AAA GCC 1872
 CTC TTT CTG CCC AAA AGA CTT AGC ATA ATC CAT TGT CCA GGA CAT CAA 1920
 AAG GGA CAC AGC GCC GAG GCT AGA GGC AAC CGG ATG GCT GAC CAA GCG 1968
 GCC CGA AAG GCA GCC ATC ACA GAG ACT CCA GAC ACC TCT ACC CTC CTC 2016
 TAG 2019

16

【0048】配列番号3

配列の長さ：27

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CTG TGA CTG GTG ACG CGT CAA CCA AGT

【0049】配列番号4

配列の長さ：34

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

GCT TTT CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT C

【0050】配列番号5

配列の長さ：25

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

GTA AGT CAT CCA TGT ACT GTA GCA G

【0051】配列番号6

配列の長さ：28

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CAT AAC GGC TAT TAG TAT AAA CAT TTA G

【0052】配列番号7

30 配列の長さ：38

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

TTC AGT TAC ATT ATG ATT TAC AGT TTA ATA CTC GGT GG

【0053】配列番号8

配列の長さ：25

配列の型：核酸（DNA）

40 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CCT ACT GGA GCA ATA AAG TTT GAA G

【0054】配列番号9

配列の長さ：23

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

配列

CCA TCT ACG ATG TCA GTA CTT CC

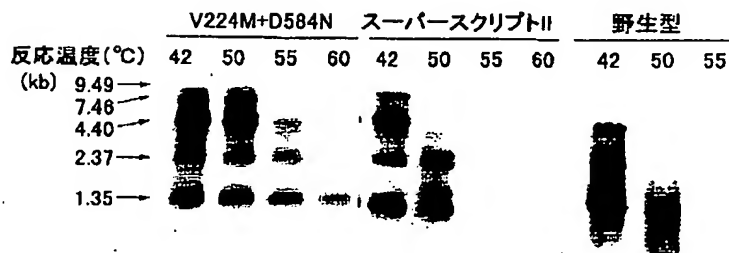
【図面の簡単な説明】

【図1】 野生型、従来のRNAse H欠失型、スーパー*

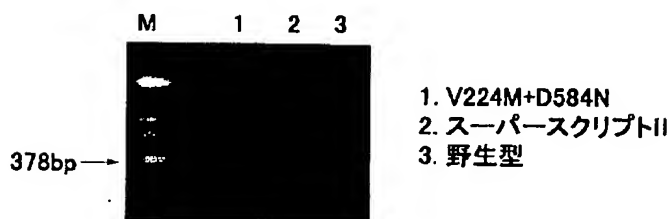
* スクリプトIIおよびV224M+D584NのcDNA合成反応における伸長性を示した図である。

【図2】 ジストロフィンmRNAを標的とした、RT-PCR増幅産物の電気泳動図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

ターマコード (参考)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:92)

Z N A

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

F ターム (参考) 4B024 BA10 CA04 DA06 HA08

4B050 CC03 DD01 FF04E FF05E

FF11E FF14E

4B065 AA26X AA95Y AB01 BA02

CA29 CA44 CA60

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.